光甘草定抗甲型流感病毒研究

陈康虹[1,4]，朱丹东[1]，刘嘉昕[4]，裘建香[4]，庞泽芬[4]，杨 博[1]，朱思琪[2]，何韵怡[2*]，刘洪波[2,3*]

（1. 桂林医科大学药学院，桂林 541199；2. 桂林医科大学医学检验学院，桂林 5411993；3. 桂林医科大学第一附属医院检验科，桂林 541001；4. 暨南大学附属广东省第二人民医院，广州 510317）

摘 要：光甘草定是一种具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗菌等多种生物学特性的黄酮类物质。本研究旨在探究光甘草定的抗甲型流感病毒（IAV）的潜能，以甲型 H1N1 流感病毒为研究对象，利用 qRT-PCR、Western blot 和空斑试验评估其在体外抗 H1N1 病毒的效果，并结合网络药理学和分子对接分析预测光甘草定抗 IAV 的作用机制。结果显示：光甘草定以浓度依赖性抑制 H1N1 病毒复制，显示出良好的抗病毒活性（$P<0.05$）；进一步利用 PharmMapper、Swiss Target Prediction 数据库和 Genecards 数据库筛选出光甘草定作用 IAV 感染的交集靶点 161 个；利用 R 语言 4.3.1 软件对上述 161 个交集靶点进行基因本体（GO）富集分析和京都基因与基因百科全书（KEGG）富集分析，结果显示，交集靶点主要参与正向调控蛋白酪氨酸激酶活性和 MAPK 级联反应，以及调控炎症反应等过程，且在卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、Rap1 信号通路等多个信号通路富集。利用 Venny 软件和 String 数据库构建交集靶点的蛋白 - 蛋白相互作用（PPI）网络，从中筛选出包括 SRC、EGFR、ESR1 等潜在核心靶点蛋白共 10 个。利用分子对接验证，结果显示，光甘草定与所有潜在核心靶点的结合能均低于 −5.00 kcal/mol，展示出了较高的结合亲和力。研究表明，光甘草定具有良好的体外抗 H1N1 病毒活性，其作用机制具有多靶点、多通路、多环节的调控特点。这为光甘草定抗 IAV 的重要功能蛋白解析及其作用机制研究提供了参考依据。

关键词：光甘草定；甲型流感病毒；网络药理学；分子对接；抗病毒活性

中图分类号：R373.1^{+}3；　　**文献标志码：**A　　**DOI：**10.3969/j.issn.1007-7146.2025.02.004

Investigation of Glabridin against Influenza A Virus

CHEN Kanghong[1,4], *ZHU Dandong*[1], *LIU Jiaxin*[4], *QIU Jianxiang*[4], *PANG Zefen*[4], *YANG Bo*[1], *ZHU Siqi*[2], *HE Yunyi*[2*], *LIU Hongbo*[2,3*]

(1. College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. College of Medical Laboratory Science, Guilin Medical University, Guilin 5411993, China; 3. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China; 4. The Affiliated Guangdong Second Provincial General Hospital of Jinan University, Guangzhou 510317, China)

Abstract: Glabridin is a flavonoid compound characterized by diverse biological properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, antitumor, and antibacterial activities. This study aimed to investigate the antiviral potential of Glabridin against influenza A virus (IAV), specifically focusing on the H1N1 strain. The qRT-PCR, Western blot analysis, and plaque assays were employed to evaluate the *in vitro* antiviral effects of Glabridin on H1N1. Furthermore, network pharmacology and molecular docking analyses were employed to predict the mechanisms underlying Glabridin antiviral action against IAV.

收稿日期：2025-01-07；**修回日期：**2025-01-25。

基金项目：国家自然科学基金项目（82160313）；广西自然科学基金项目（2020GXNSFDA297027）；广西高校大学生创新创业计划项目（202410601058）。

作者简介：陈康虹，硕士研究生。

***通信作者：**刘洪波，教授，主要从事分子诊断和新型疫苗研究，E-mail: hbliu@glmc.edu.cn；
何韵怡，检验技师，主要从事分子诊断和疫苗研究，E-mail: 222022506@glmc.edu.cn。

The results revealed that Glabridin inhibited H1N1 virus replication in a concentration-dependent manner and exhibited significant antiviral activity ($P<0.05$). Pharm Mapper, Swiss Target Prediction database and Genecards database were further utilized to screen the intersection targets of Glabridin on IAV infection, and 161 overlapping targets were finally selected. R software version 4.3.1 was used to perform gene ontology (GO) enrichment and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses on these 161 overlapping targets. The results indicated that the overlapping targets were primarily implicated in processes such as the positive regulation of protein tyrosine kinase activity, the MAPK cascade, and the modulation of inflammatory responses. Moreover, these targets were enriched in various signaling pathways, including Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and the Rap1 signaling pathway. Venny software and String database were employed to construct the protein-protein interaction (PPI) network of the above-mentioned 161 overlapping targets, and a total of 10 potential core target proteins including SRC, EGFR, ESR1 were screened out. And the binding energies of Glabridin to all potential core targets were lower than –5.00 kcal/mol, indicating a high binding affinity. The results of this study indicated that Glabridin exhibits significant *in vitro* antiviral activity against the H1N1 virus, and its mechanism of action has the characteristics of multi-target, multi-pathway and multi-link regulation, which provides a reference for the elucidation of important functional proteins and the action mechanism of Glabridin against IAV.

Key words: Glabridin; influenza A virus; network pharmacology; molecular docking; antiviral activity

（*Acta Laser Biology Sinica*, 2025, 34(2): 121-131）

甲型流感病毒（influenza A virus, IAV）是引起人类流行性感冒的主要病原体之一，具有变异性高、传染性强、传播速度快、流行范围广的特点，已成为近年来影响我国公共卫生安全的重要威胁[1]。IAV属于正黏病毒科，为有囊膜的单股负链RNA病毒，其基因组可编码包括血凝素蛋白（hemagglutinin, HA）、神经氨酸酶蛋白（neuraminidase, NA）、核蛋白（nucleoprotein, NP）、基质蛋白1（matrix protein 1, M1）和基质蛋白2（matrix protein 2, M2）等10种蛋白[2]。其中，HA和NA可根据其抗原性不同将IAV分为多种亚型，如H1N1、H3N3、H5N1等[3-4]。H1N1为人类最常感染的IAV亚型之一，常引发季节性大流行，威胁公共卫生安全[5]。接种疫苗是预防和控制IAV流行的最有效手段之一，然而，IAV表现出的抗原漂移和抗原转换使得IAV疫苗的时效性严重受限。在传统药物治疗方面，目前临床以经典抗病毒药物治疗为主，如NA抑制剂和M2离子通道阻滞剂等，但其疗效往往受到耐药性和不良反应限制[6-7]。因此，研发安全有效的新型抗IAV药物刻不容缓。

光甘草定（Glabridin）是从光果甘草（*Glycyrrhiza glabra*）的根中提取的一种异戊二烯化异构体，具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗菌、保护心血管、保护神经和保护肝脏等多种生物学作用[8-18]。近年来的研究表明，光甘草定在SARS-CoV-2[19-20]、乙型肝炎病毒[21]、登革病毒等[22]多种病毒感染模型中展现出了显著的抗病毒功能。然而，截至目前，尚未见光甘草定抗IAV感染相关的研究报道。网络药理学是一种基于系统生物学，综合运用药理学、计算机科学以及信息网络技术，通过网络相互作用的联系阐明中药有效成分的药理作用及参与疾病的作用机制的新兴研究方法，可为复杂疾病的药物发现与筛选提供创新的思路[23]。本研究以H1N1病毒为研究对象，运用体外细胞试验验证光甘草定的抗IAV效果，运用网络药理学预测及分子对接分析光甘草定可能的抗IAV感染机制，为光甘草定作为抗流感药物的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物、细胞及毒株

光甘草定购自美国MCE公司；人非小细胞肺癌细胞A549购自湖南丰晖细胞库；犬肾细胞MDCK购自上海中科细胞库；甲型H1N1流感病毒[A/WSN/33（H1N1）]由广州医科大学潘攀老师课题组馈赠。

1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清购自ExCell Bio公司；二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide DMSO）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；CCK-8细胞增殖试剂盒购自UElandy公司；RNA提取试剂盒购自Foregene公司；ReverTra Ace qPCR RT Kit试剂盒和2×SYBR Green Real-time PCR Mix试剂盒购自TOYOBO公

司; 兔抗 NP（GTX 125989）购自 GeneTex 公司; 鼠抗甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）（ab8245）、HRP 标记二抗均购自 abcam 公司; 酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司; qRT-PCR 分析仪购自 Hoffmann-La Roche 公司; 全自动化学发光仪购自 Thermo 公司。

1.3　光甘草定溶液配置

取 5 mg 光甘草定粉末, 以 616 μL DMSO 为溶剂, 通过涡旋混合使其充分溶解, 制备成 25 mmol/L 的光甘草定浓缩溶液。

1.4　CCK-8 试验检测光甘草定对 A549 细胞生长的影响

将 A549 细胞以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种至 96 孔板, 置于 37℃、5% CO_2 条件下过夜培养。待孔板细胞完全贴壁后, 分别用 10、15、20、30、50、80、100 μmol/L 光甘草定溶液处理细胞, 同时设置空白对照组、细胞对照组、DMSO 对照组, 每组设 5 个复孔; 继续置于 37℃、5% CO_2 条件下培养 48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂; 37℃、5% CO_2 条件下培养 2 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 处检测吸光值, 以计算细胞活力 (%)。

1.5　qRT-PCR 试验检测光甘草定对 H1N1 病毒基因转录水平的影响

将 A549 细胞以每孔 1.26×10^5 个细胞的密度接种至 12 孔板中, 置于 37℃、5% CO_2 条件下过夜培养。待孔板细胞完全贴壁后, 用 30 μmol/L 的光甘草定溶液处理 3 h, 加入 H1N1 病毒（MOI=0.2）以进行感染, 并分别在感染后 12、24 h 收集感染细胞样品。使用 Pierce™ IP Lysis Buffer 对收集的细胞进行裂解处理 10 min 后, 在 4℃条件下 12 000 r/min 离心 3 min, 收集上清液作为检测样本。使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 并应用转录试剂盒进行逆转录合成 cDNA; 通过 LC480 荧光定量 PCR 仪进行片段扩增, 以 *GAPDH* 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1　引物序列信息

Tab. 1　Primer sequence information

Gene	Primer sequence
NP	F: 5′-TGCTTCAAAACAGCCAAGTG-3′
	R: 5′-GATGCCCTCTGTTGATTGGT-3′
GAPDH	F: 5′-AGGGCAATGCCAGCCCCAGCG-3′
	R: 5′-AGGCGTCGGAGGGCCCCCTC-3′

1.6　Western blot 试验检测光甘草定对 H1N1 病毒蛋白表达的影响

对上述 1.5 收集的检测样本进行凝胶电泳, 转膜, 利用 5% 脱脂奶粉溶液进行膜封闭 2 h; 加入 Rabbit anti-NP、Mouse anti-GAPDH 作为一抗, 4℃孵育过夜; 加入相应的 HRP 偶联 IgG 的二抗室温孵育 1 h; 加入显色剂后, 使用凝胶成像系统进行信号检测和图像分析。其中封闭、一抗孵育、二抗孵育和显影之间分别用三羟甲基氨基甲烷缓冲液（tris buffered saline tween, TBST）进行 3 次洗膜。

1.7　空斑法测定光甘草定对流感病毒复制的抑制作用

收集 1.5 方法中样品上清进行空斑试验, 将 MDCK 细胞以每孔 1.26×10^6 细胞的密度接种至 12 孔板上, 置于 37℃、5% CO_2 条件下过夜培养。待孔板细胞完全贴壁后, 用磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline, PBS）洗涤 3 次, 将病毒上清液稀释 10 倍后与细胞一起孵育 1 h, 弃去病毒液, 加入 2 mL 新鲜等体积配制的 2× 无血清 DMEM 和 3% 微晶纤维素混合培养基［含有 1 μg/mL N-（对甲苯磺酰基）-L- 苯丙氨酰甲基氯酮（TPCK）胰蛋白酶］以覆盖 MDCK 细胞。48 h 后用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 并用 2% 结晶紫染色 10 min。采用 Adobe Photoshop 进行噬斑面积分析, 以计算病毒滴度。调整图像对比度以增强噬斑识别, 在每个板中心选择 42 436 个像素的标准圆形区域, 避免边缘伪影。通过“颜色范围”功能识别区域内白色像素面积, 并计算其与总像素面积的比例, 得出噬斑面积百分比。使用 Microsoft Excel 2016 分析结果, 并对重复试验数据取平均值。

1.8　光甘草定的作用靶点获取

从 PubChem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov）中下载光甘草定的结构（PubChem CID: 124052）, 并将其上传至 PharmMapper 数据库（http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html）, 选择“Human Protein Targets Only”预测潜在的靶点。利用 Swiss Target Prediction 数据库（http://www.swisstargetprediction.ch/）进一步预测光甘草定可能作用的靶点[24]。将预测所得的光甘草定靶点导入 UniProt 数据库（https://www.uniprot.org/）, 去除重复的靶点, 并将靶点名称转换为官方的基因符号。

1.9　IAV 靶点获取

利用 Genecards 数据库（https://www.genecards.

org/), 以 “Influenza A virus” 为检索关键词, 限定物种为 “*Homo sapiens*” 进行检索, 并对检索结果进行去重及靶点名称校正处理, 从而获取 IAV 靶点数据集。

1.10 光甘草定治疗 IAV 的靶点获取

利用韦恩图工具 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/) 绘制上述方法获得的光甘草定靶点和 IAV 靶点的韦恩图谱与交集基因, 这些交集基因即为光甘草定治疗 IAV 的潜在靶点。

1.11 基因本体 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

利用 R 语言 4.3.1 软件对上述交集靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析, 设定 P value＜0.01、q value＜0.01 作为判断富集结果具有统计学显著性的标准, 并根据 P 和 q 值从小到大的排序, 在所得到的 GO 富集结果中筛选出前 10 个条目绘制成双向条形图, 在 KEGG 富集结果中则筛选出前 20 个条目绘制成气泡图。

1.12 蛋白 - 蛋白相互作用 (PPI) 网络图构建

将交集基因上传至 String 数据库 (https: //string-db.org), 设置目标物种为 “*Homo sapiens*”, 限定蛋白相互作用阈值 ＞0.4, 生成蛋白 - 蛋白相互作用 (protein-protein interaction networks, PPI) 网络数据。将 PPI 网络数据导入 Cytoscape 3.72 软件构建 PPI 网络图[25], 并通过计算拓扑学参数 Degree 值, 筛选 Degree 值排名前 10 的基因, 作为 “核心靶点” 进行后续研究。

1.13 分子对接验证

从 PDB (Protein Data Bank) 蛋白数据库 (https://www.rcsb.org/) 中下载目标核心靶点蛋白的 3D 结构, 从 PubChem 数据库中下载光甘草定的小分子结构; 通过 PyMOL 2.4.0 对目标核心靶点蛋白进行预处理 (包括去除水分子和已有配体分子等), 再利用 AutoDockTools 1.5.6 进行加氢处理和电荷分布计算; 将核心蛋白和光甘草定小分子分别转换成 pdbqt 格式, 通过插件 (“autogrid” 及 “autodock”) 实现靶点对接[24], 并以结合能大小评估对接效果, 其中结合能低于 –5.00 kcal/mol 表明存在较高的结合相互作用。通过 PyMol 2.4.0 进行可视化展示对接结果。

1.14 统计学分析

采用 SPSS 25 软件进行数据处理, GraphPad Prism 9.0 软件作图。所有数据均符合正态分布, 以平均值 ± 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 Dunnett's t 检验。P＜0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 光甘草定干预 A549 细胞作用浓度筛选

试验结果显示, 0 ~ 30 μmol/L 浓度范围内的光甘草定组的细胞活力与对照组相比, 差异无统计学意义 (P＞0.05); 50、80、100 μmol/L 浓度光甘草定组的细胞活力显著低于对照组 (P＜0.05), 表现出细胞毒性 (图 1)。因此, 本研究选择 30 μmol/L 为光甘草定最佳作用浓度用于后续试验。

2.2 光甘草定对 H1N1 NP 的 mRNA 和蛋白质的表达水平的影响

qRT-PCR 结果显示 (图 2a): 与病毒感染组相比, 光甘草定处理 12 h 后 H1N1 NP 的 mRNA 表达水平变化无统计学意义 (P＞0.05); 处理 24 h 后 H1N1 NP 的 mRNA 表达水平明显降低 (P＜0.05)。Western blot 结果显示, H1N1 NP 的蛋白质表达量随光甘草定作用浓度的增加而降低 (P＜0.05) (图 2b、2c), 表明光甘草定对 H1N1 流感病毒基因和蛋白质的表达具有抑制作用。

2.3 光甘草定对 H1N1 病毒增殖的影响

空斑试验结果显示, 病毒对照组由于 H1N1 病毒粒子的复制增殖造成局部细胞病变及死亡脱落而形成明显的空斑。与病毒感染组相比, 光甘草定处理 18 h 和 24 h 后, 由 H1N1 病毒诱导所致的细胞空斑面积均明显减少 (P＜0.01) (图 3)。

2.4 光甘草定治疗 IAV 的潜在靶点

利用 PharmMapper 数据库和 Swiss Target Prediction 数据库筛选, 在去除重复基因后得到了 354 个光甘草定治疗相关的基因靶点; 利用 Genecards 数据库筛选得到 2 761 个具有代表性的 IAV 相关靶点。将上述 354 个光甘草定靶点与 2 761 个 IAV 靶点进行交叉, 共获得 161 个交集靶点, 这些靶点被认为是光甘草定治疗 IAV 的潜在靶点 (图 4)。

2.5 GO 和 KEGG 富集分析结果

利用 R 语言 4.3.1 软件对上述 161 个交集靶点进行 GO 与 KEGG 富集分析。GO 富集分析结果显示: 在生物过程 (biological process, BP) 中涉及激酶

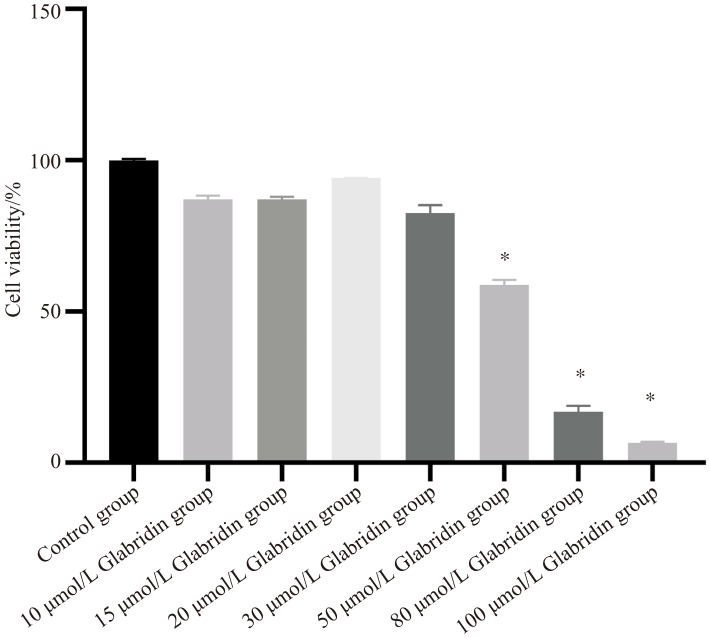


图 1　CCK-8 检测不同浓度光甘草定对 A549 细胞活力的影响

Fig. 1　CCK-8 assay to detect the effect of different concentrations of Glabridin on the viability of A549 cells

与对照组相比, $^{*}P<0.05$。

Compared with control group, $^{*}P<0.05$.

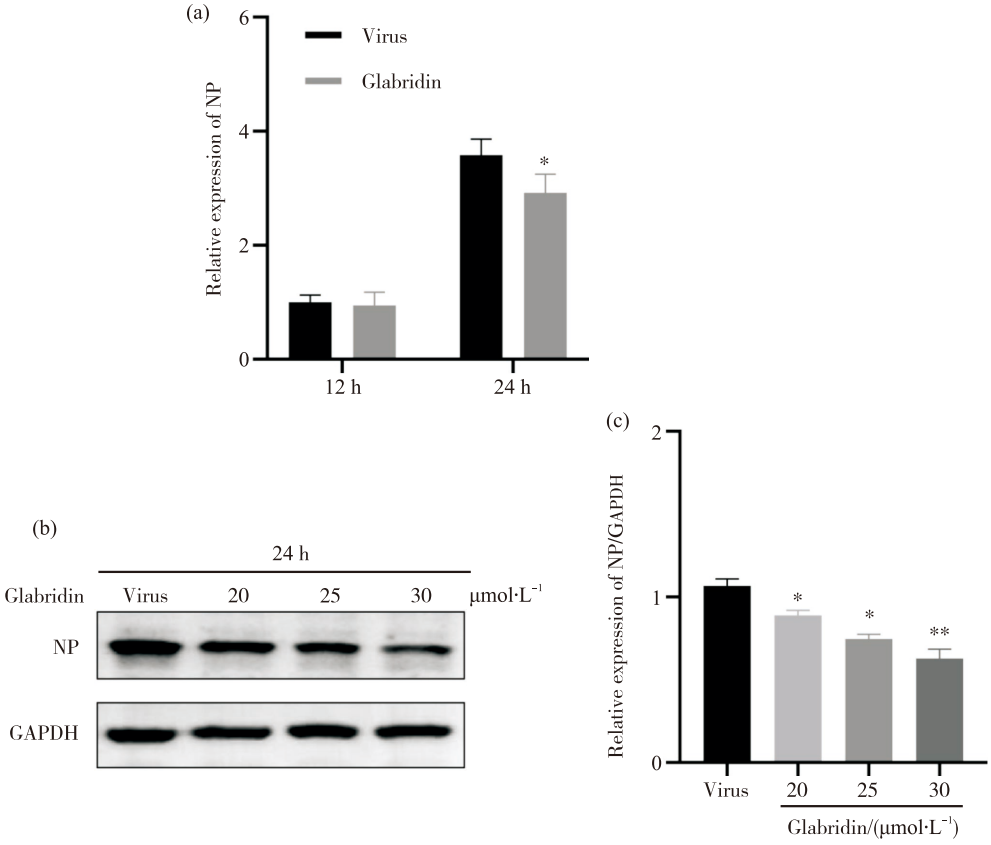


图 2　各组细胞中 H1N1 NP 的 mRNA 和蛋白质的表达水平

Fig. 2　The expression levels of H1N1 NP mRNA and protein in cells of each group

(a) H1N1 NP mRNA 水平；(b) 蛋白质印迹观察；(c) NP 蛋白水平灰度分析。与病毒组相比, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$。

(a) H1N1 NP mRNA levels; (b) Western blot analysis; (c) Densitometric analysis of NP protein levels. Compared with virus group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

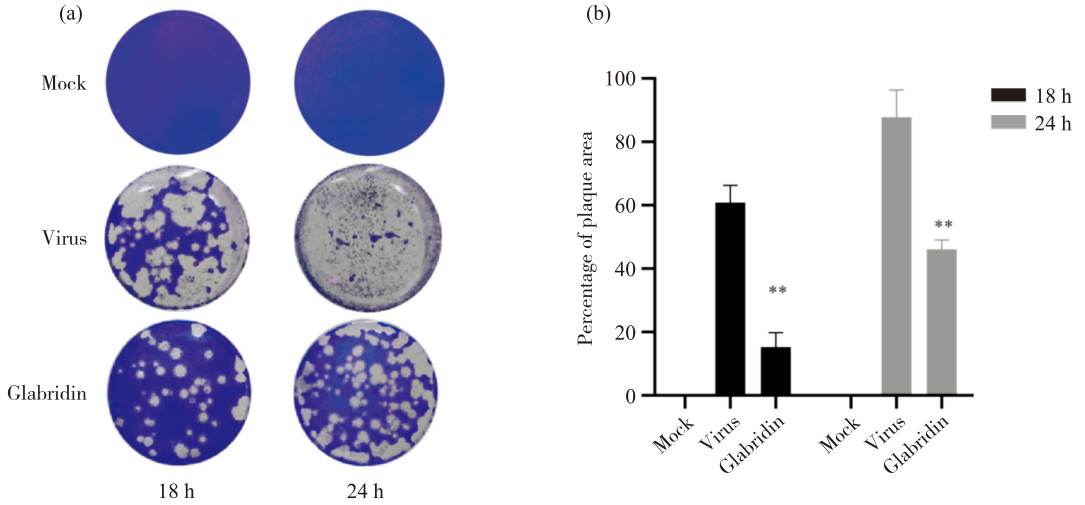


图 3　空斑试验检测光甘草定对 H1N1 病毒增殖的影响

Fig. 3　Inhibitory effect of Glabridin on H1N1 replication by plaque assay

(a) 光甘草定抑制 H1N1 病毒的空斑形成；(b) 空斑面积统计分析。与病毒组相比，$^{**}P<0.01$。

(a) The inhibition of H1N1 viral plaque formation by Glabridin; (b) The statistical analysis of plaque area. Compared with virus group, $^{**}P<0.01$.

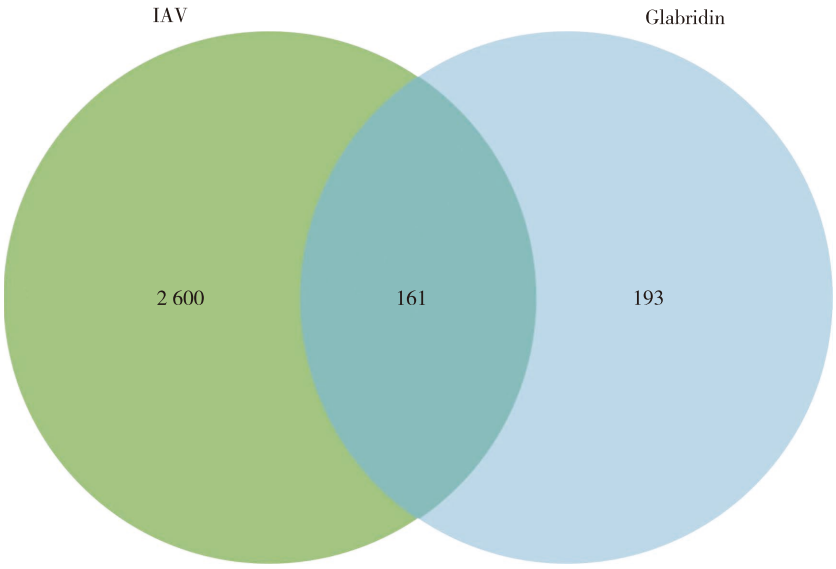


图 4　光甘草定与 IAV 交集靶点的韦恩图

Fig. 4　The Venn diagram of cross-targets of Glabridin and IAV

活性的正向调节、MAPK 级联反应的正向调控、炎症反应的调节以及细胞因子生成调控等；在细胞组分（cell component, CC）中涉及膜筏、膜微域和病灶黏附等；在分子功能（molecular function, MF）中涉及非跨膜蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性和丝氨酸型肽酶活性等（图 5）。KEGG 富集分析结果表明，Top20 信号通路中主要包括卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、Rap1 信号通路、前列腺癌、趋化因子信号通路、内分泌抵抗 FoxO 信号通路以及 AGE-RAGE 信号通路等（图 6），表明光甘草定可能通过多靶点、多通路协调发挥抗 IAV 作用。

2.6　PPI 网络分析结果

利用 Cytoscape 3.9.1 软件对 2.4 所述的 161 个交集靶点进行 PPI 网络图构建，结果如图 7a 所示，该网络包含 88 个节点和 228 条边。进一步利用 Cytoscape 和 CytoHubba 软件进行拓扑学分析，计算每个节点的 Degree 值，确定了排名前 10 的核心靶点蛋白，依次为 IGF1R、HSP90AA1、MAPK8、HRAS、EGFR、SRC、PTPN11、PIK3R1、PIK3CD、ESR1。在 PPI 网络中提取上述 10 个核心靶点蛋白，构建核心靶点蛋白的 PPI 网络图（图 7b），结果提示，这些蛋白可能是光甘草定在抗 IAV 过程中发挥关键

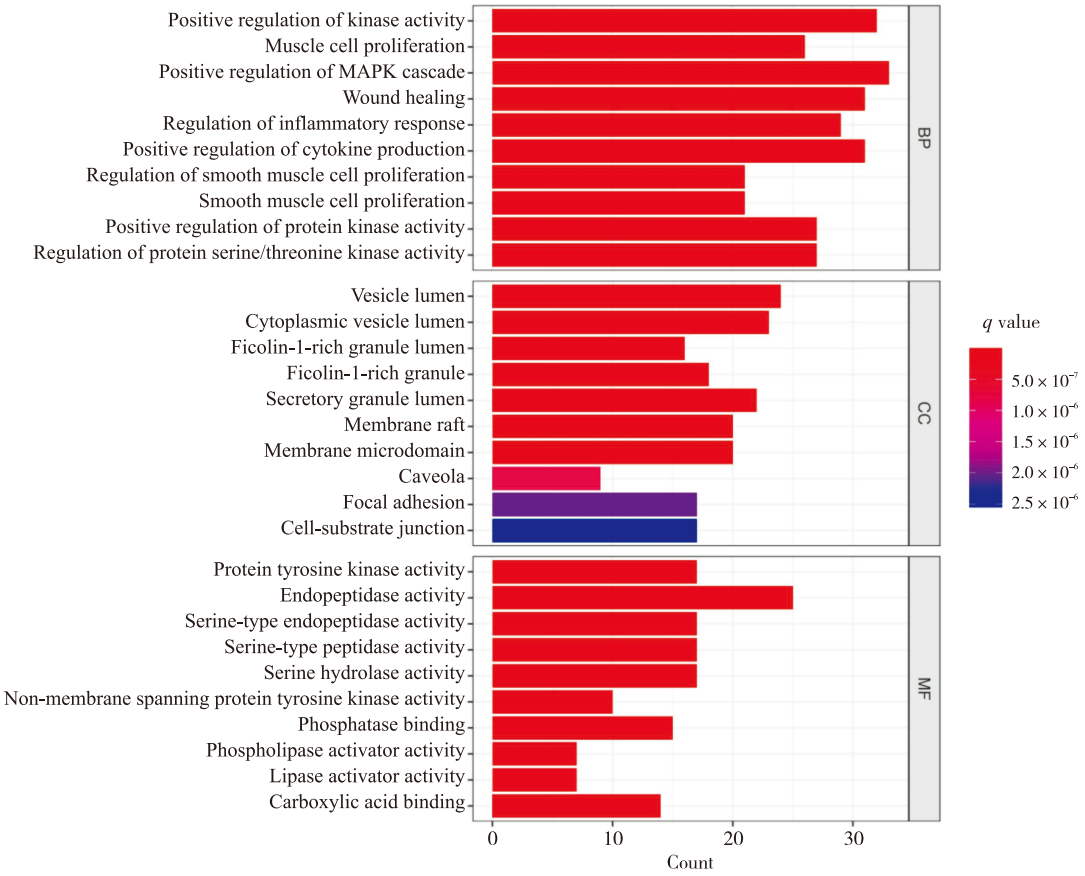


图 5　交集靶点的 GO 富集分析图

Fig. 5　GO enrichment analysis diagram of cross-targets

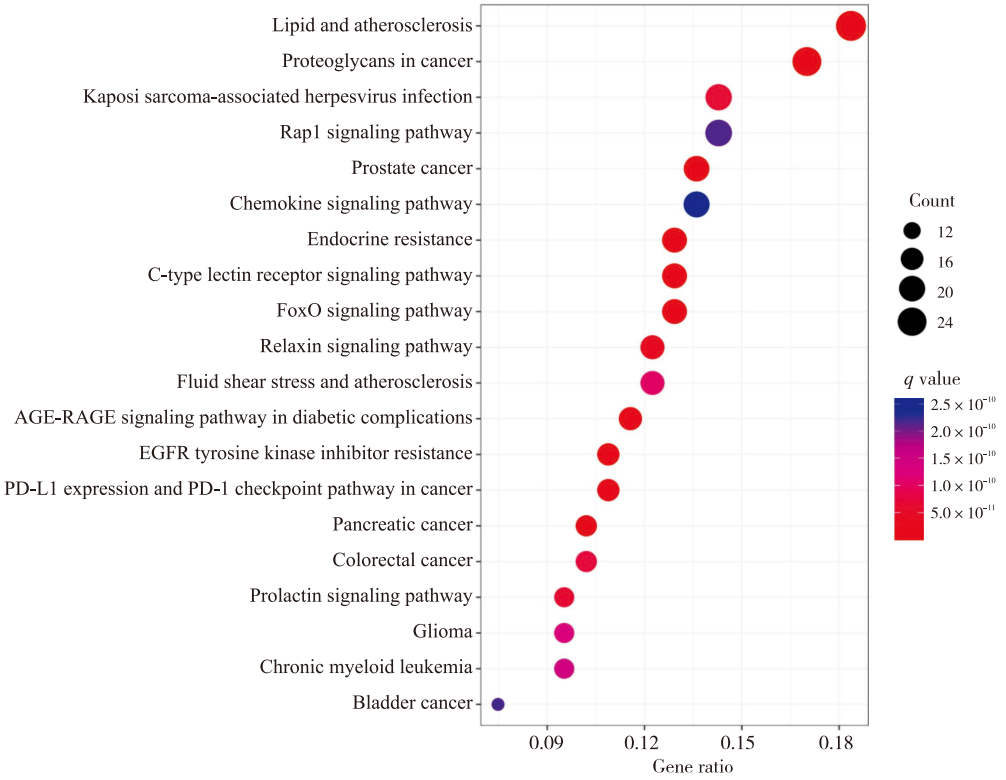


图 6　交集靶点的 KEGG 富集分析图

Fig. 6　KEGG pathway enrichment analysis diagram of cross-targets

作用的核心靶点。

2.7 分子对接结果分析

将 2.6 所述的 10 个核心靶点蛋白分别与光甘草定（化学结构如图 8 所示）进行分子对接分析，对接结果通过 PyMol 2.4.0 软件进行可视化展示（图 9）。结果显示，所有核心靶点蛋白与光甘草定的结合能均低于 –5.00 kcal/mol，其中，光甘草定与 HRAS 蛋白的结合能最低，为 –9.85 kcal/mol，其次是 MAPK8、SRC、PIK3CD 蛋白等（表 2），表明各组结合构象均非常稳定[26]，初步验证了网络药理学的挖掘结果。潜在的结合位点主要有 LYS-295、MET-341、TYR-390、THR-397、SER-393、PHE-398、PHE-392、MET-793、PHE-587 等氨基酸残基（图 9）。其中光甘草定与 MAPK8 受体的活性残基形成 5 个氢键，多于其他药物活性成分，说明该化合物与蛋白结合口袋结合较强。

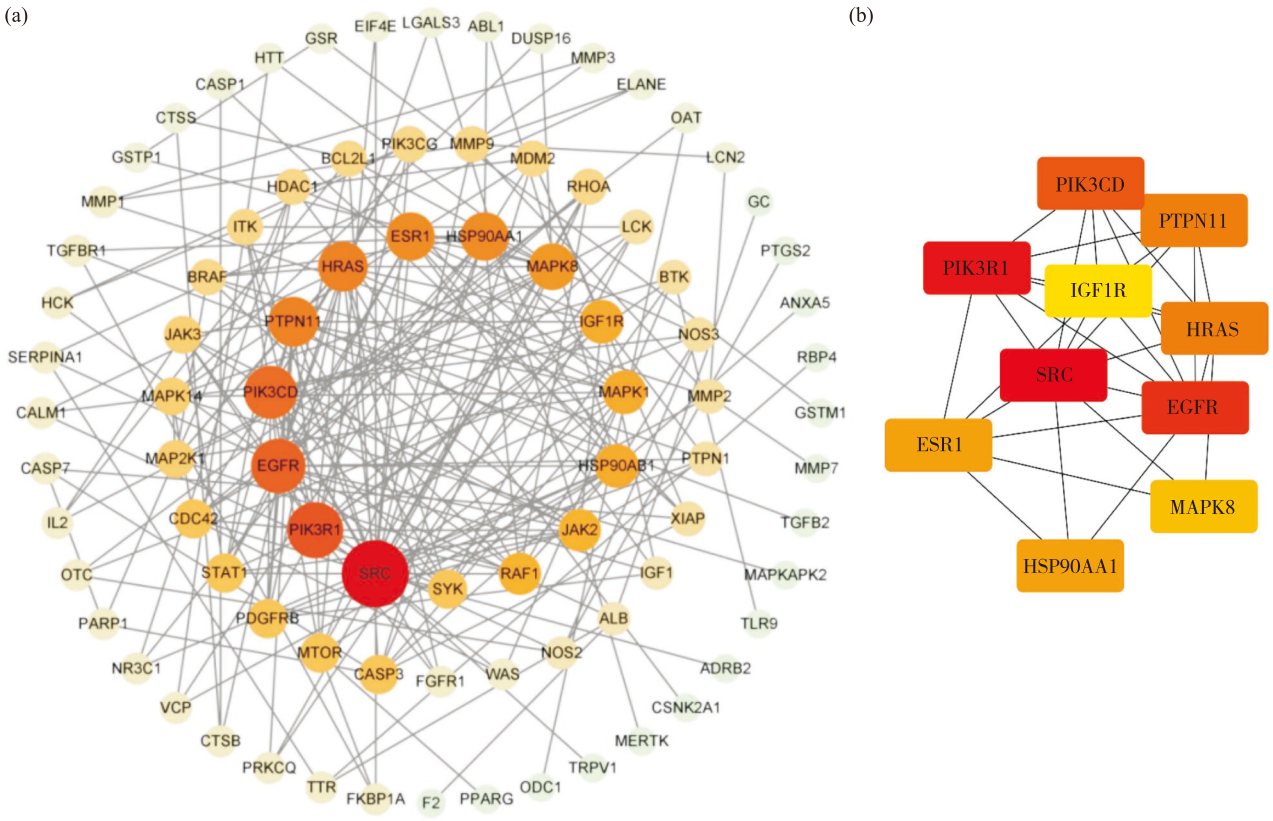
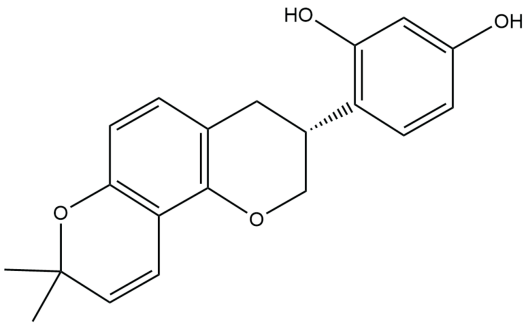


图 7 从 PPI 网络中鉴定核心靶点

Fig. 7 Identification of core targets from the PPI network

(a) PPI 网络图；(b) 核心靶点蛋白的 PPI 子网络图。

(a) The PPI network; (b) The PPI sub-network of core proteins.



Glabridin
CAS No:59870-68-7

图 8 光甘草定化学结构

Fig. 8 Chemical structure of glabridin

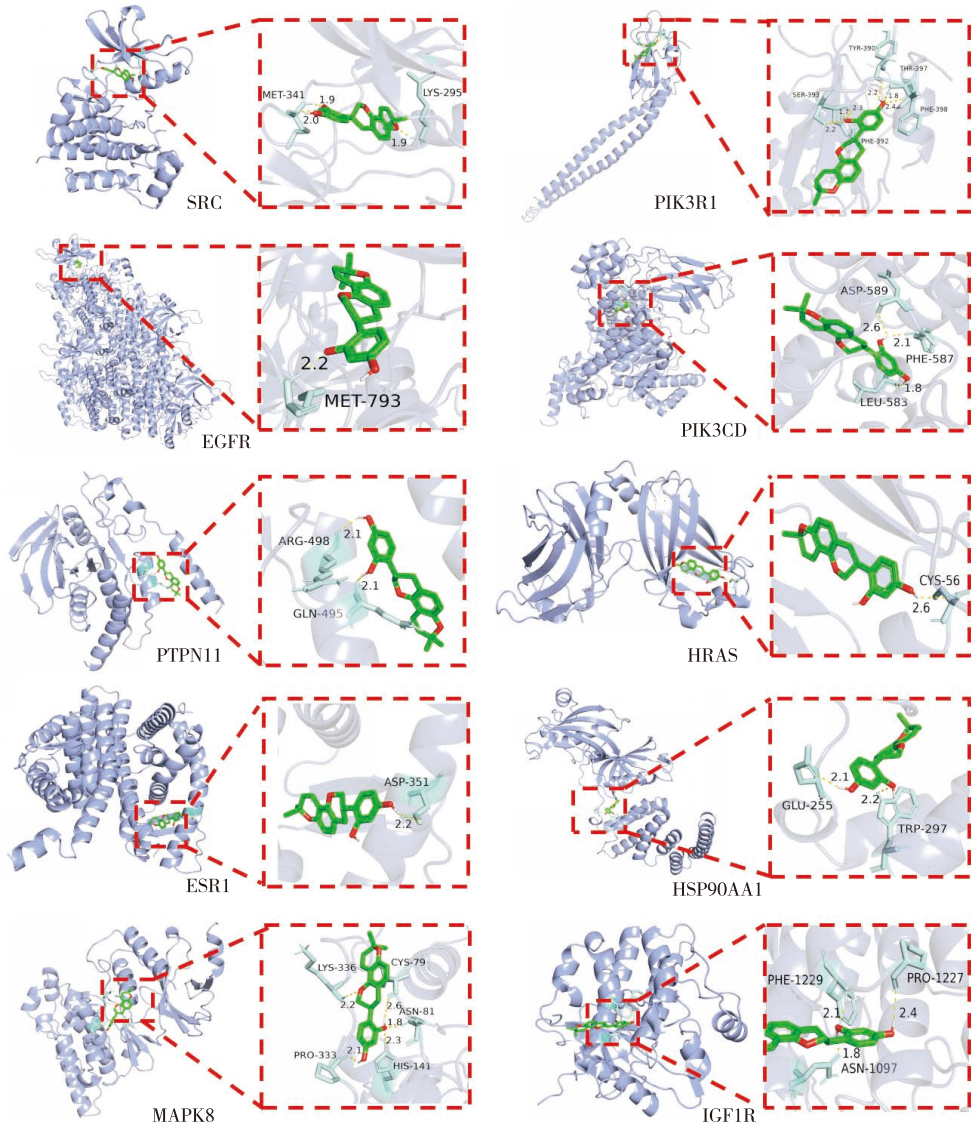


图 9　光甘草定与核心靶点的分子对接模式图

Fig. 9　Diagram of molecular docking pattern between Glabridin and the core targets

表 2　光甘草定与核心靶点的分子对接结合能

Tab. 2　Docking and binding energy of Glabridin and core target molecules

PDB ID	Target protein	Binding energy/(kcal·mol^{-1})
7qf9	HRAS	−9.85
2xrw	MAPK8	−8.94
2bdj	SRC	−8.80
4xe0	PIK3CD	−8.12
3b7o	PTPN11	−8.12
1k3a	IGF1R	−8.10
5gty	EGFR	−7.78
6pfm	ESR1	−7.45
3hiz	PIK3R1	−6.95
5njx	HSP90AA1	−5.94

3　讨论

IAV 为最具威胁的流感病毒类型，曾多次引起世界性大流行，严重威胁公共卫生安全。由于 IAV 具有高度的变异性，使得其能够不断产生新的毒株，导致 IAV 疫苗的抗病毒效果大大降低。近年来，国内学者在广泛探索中药的抗病毒潜能，已有多项研究表明，光甘草定在多种病毒感染模型中展现出显著的抗病毒功能，例如，光甘草定可通过结合 SARS-CoV-2 主要蛋白酶（Mpro）的 His41 和 Met49 位点，从而抑制其蛋白酶活性和病毒复制[19]，也可以通过与 Mpro 活性位点形成稳定的氢键，从而阻断病毒的复制[20]。NS3 蛋白是酶影响登革病毒基因组 RNA 的复制、转录翻译等的重要的蛋白酶，光

甘草定与NS3蛋白相互作用表现出–8.10 kcal/mol的强大结合亲和力，是潜在的NS3蛋白酶抑制剂[22]。此外，研究还发现，光甘草定可以通过诱导细胞表面钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白的内吞作用来抑制乙肝病毒感染[21]。但是，截至目前尚未见光甘草定抗IAV感染相关的研究报道。

NP蛋白是一种包衣IAV负链RNA的结构蛋白，在IAV整个生命周期起着关键作用，可调节病毒RNA模板的转录、复制以及在感染时诱导免疫抑制等[27]。本研究通过qRT-PCR试验发现，以30 μmol/L的光甘草定安全作用浓度处理H1N1病毒，24 h后表现出了明显的*NP* mRNA转录抑制作用（$P<0.05$）。Western blot试验结果显示，选用系列浓度光甘草定处理后，NP蛋白的表达呈现出浓度依赖性降低（$P<0.05$）。与此同时，空斑试验结果显示，光甘草定可以显著降低H1N1病毒感染引起的空斑数量，有效抑制子代病毒的产生。这些结果均表明，光甘草定在体外具有良好的抗H1N1病毒活性。为了分析光甘草定治疗IAV的可能机制，本研究利用网络药理学进行预测分析，筛选出161个光甘草定治疗IAV的潜在靶点，并对潜在靶点进行了GO富集分析和KEGG富集分析。GO富集分析结果显示，光甘草定可能通过正向调控蛋白酪氨酸激酶活性和MAPK级联反应，以及调控炎症反应、蛋白酪氨酸激酶活性等方式作用于IAV。KEGG富集分析结果显示，光甘草定的抗病毒作用主要富集于卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、Rap1信号通路、前列腺癌、趋化因子信号通路、内分泌抵抗FoxO信号通路等信号通路，提示光甘草定可能通过调节炎症反应和调控细胞周期进程等核心通路，影响细胞的代谢与凋亡过程抵抗IAV感染。以上研究结果表明，光甘草定是通过作用于多个关键靶点，调节多条生物学通路共同参与对IAV感染的抵抗。

为进一步探究光甘草定抗IAV的潜在作用机制，本研究构建了潜在靶点的PPI网络，并从PPI网络中筛选出10个光甘草定在抗IAV过程中发挥关键作用的核心靶点，分别是PIK3CD、PIK3R1、PTPN11、IGF1R、HRAS、SRC、EGFR、ESR1、MAPK8、HSP90AA1。已有多项研究表明，这些核心靶点在IAV感染过程中扮演重要角色。例如：Wu等[28]研究发现，IAV感染显著上调了小鼠肺组织中的PIK3CD表达，抑制PIK3CD与减轻IAV和炎症相关；Rahman等[29]研究发现，槲皮素可能通过调节IGF1R的信号通路来抑制流感病毒的复制；Eierhoff等[30]研究发现，IAV附着于细胞会导致脂筏聚集，并诱导脂筏中的EGFR聚集且活化，从而触发EGFR与病毒的内化。与此同时，Wang等[31]研究发现，EGFR可以促进IAV进入到宿主细胞，并激活PI3K/AKT信号通路，从而增强病毒摄取；Zhang等[32]的研究表明，MAPK8蛋白在IAV感染期间的病毒基因组RNA和蛋白质合成调节中起关键作用，抑制MAPK8激活可有效减少感染早期IAV复制；Wang等[33]研究发现，IAV可通过调节HSP90AA1促进病毒在宿主细胞中的复制。为了验证光甘草定与核心靶点的相互作用，本研究采取了分子对接手段验证。结果发现，光甘草定与10个核心靶点间均存在较好的亲和力，进一步表明本研究中的网络药理学预测结果的可靠性。在所有的核心蛋白中，HRAS、MAPK8和SRC蛋白与光甘草定的结合能均不高于–8.80 kcal/mol，展现出显著的高结合亲和力，提示该三种蛋白可能是光甘草定抗IAV的核心作用成分。

综上所述，光甘草定具有良好的体外抗H1N1病毒活性，可能通过调节炎症反应和调控细胞周期进程等核心通路影响细胞的代谢与凋亡过程，从而发挥抗IAV作用，具有多靶点、多通路、多环节的调控特点。但鉴于本研究中的光甘草定抗IAV机制研究主要基于网络药理学和分子对接技术，方法具有局限性，缺乏直接试验证据。因此，后续我们将结合体内外试验，进一步地验证光甘草定与上述核心蛋白相关通路的关系，探究光甘草定针对IAV靶点的具体作用机制。

参考文献（References）：

[1] GAITONDE D Y, MOORE F C, MORGAN M K. Influenza: diagnosis and treatment[J]. American Family Physician, 2019, 100(12): 751-758.

[2] LI R, LIU T, LIU M, *et al*. Anti-influenza A virus activity of dendrobine and its mechanism of action[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(18): 3665-3674.

[3] 曾祥兴, 李康生. 流感百年: 20世纪流感大流行的回顾与启示[J]. 医学与社会, 2010, 23(11): 4-6.
ZENG Xiangxing, LI Kangsheng. The pandemic history of influenza: review and revelation of the influenza pandemic in last century[J]. Medicine and Society, 2010, 23(11): 4-6.

[4] HUTCHINSON E C. Influenza virus[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(9): 809-810.

[5] CHENG P, ZHAI K, HAN W, *et al*. Characterizing the antigenic evolution of pandemic influenza A (H1N1) pdm09 from 2009 to

2023[J]. Journal of Medical Virology, 2024; 96(5): e29657.

[6] EL-SHESHENY R, BAGATO O, KANDEIL A, *et al.* Re-emergence of amantadine-resistant variants among highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in Egypt[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2016, 46: 102-109.

[7] LIN C Y, YANG Z S, WANG W H, *et al.* The antiviral role of galectins toward influenza A virus infection: an alternative strategy for influenza therapy[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2021, 14(5): 490.

[8] HOSSEINZADEH H, NASSIRI-ASL M. Pharmacological effects of *Glycyrrhiza* spp. and its bioactive constituents: update and review[J]. Phytotherapy Research, 2015, 29(12): 1868-1886.

[9] HOSSEINZADEH L, MODARRESI M, MANOOCHEHRI Y, *et al.* Protective effects of Glabridin against cytotoxicity and oxidative stress induced by doxorubicin in PC12 cells[J]. Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences, 2017, 6(1): 1-12.

[10] SIMMLER C, PAULI G F, CHEN S N. Phytochemistry and biological properties of Glabridin[J]. Fitoterapia, 2013, 90: 160-184.

[11] AOKI F, NAKAGAWA K, KITANO M, *et al.* Clinical safety of licorice flavonoid oil (LFO) and pharmacokinetics of Glabridin in healthy humans[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2007, 26(3): 209-218.

[12] HSIEH M J, CHEN M K, CHEN C J, *et al*. Glabridin induces apoptosis and autophagy through JNK1/2 pathway in human hepatoma cells[J]. Phytomedicine, 2016, 23(4): 359-366.

[13] CHEEMA H S, PRAKASH O, PAL A, *et al.* Glabridin induces oxidative stress mediated apoptosis like cell death of malaria parasite Plasmodium falciparum[J]. Parasitology International, 2014, 63(2): 349-358.

[14] HUANG H L, HSIEH M J, CHIEN M H, *et al.* Glabridin mediate caspases activation and induces apoptosis through JNK1/2 and p38 MAPK pathway in human promyelocytic leukemia cells[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98943.

[15] HSU Y L, WU L Y, HOU M F, *et al.* Glabridin, an isoflavan from licorice root, inhibits migration, invasion and angiogenesis of MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells by inhibiting focal adhesion kinase/Rho signaling pathway[J]. Molecular Nutrition Food Research, 2011, 55(2): 318-327.

[16] KIM H S, SUH K S, KO A, *et al*. The flavonoid Glabridin attenuates 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage and cellular dysfunction in MC3T3-E1 osteoblastic cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2013, 31(1): 243-251.

[17] MODARRESI M, HAJIALYANI M, MOASEFI N, *et al*. Evaluation of the cytotoxic and apoptogenic effects of Glabridin and its effect on cytotoxicity and apoptosis induced by doxorubicin toward cancerous cells[J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2019, 9(3): 481-489.

[18] ZHANG Q, QIAN D, TANG D D, *et al*. Glabridin from *Glycyrrhiza glabra* possesses a therapeutic role against keloid via attenuating PI3K/Akt and transforming growth factor-beta1/SMAD signaling pathways[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(35): 10782-10793.

[19] ISLAM R, PARVES M R, PAUL A S, *et al*. A molecular modeling approach to identify effective antiviral phytochemicals against the main protease of SARS-CoV-2[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021, 39(9): 3213-3224.

[20] CHOE J, HAR YONG P, XIANG NG Z. The efficacy of traditional medicinal plants in modulating the main protease of SARS-CoV-2 and cytokine ctorm[J]. Chemistry Biodiversity, 2022, 19(11): e202200655.

[21] MIYAKAWA K, MATSUNAGA S, YAMAOKA Y, *et al*. Development of a cell-based assay to identify hepatitis B virusentry inhibitors targeting the sodium taurocholate cotransporting polypeptide[J]. Oncotarget, 2018, 9(34): 23681-23694.

[22] RAHMAN M M, BISWAS S, ISLAM K J, *et al*. Antiviral phytochemicals as potent inhibitors against NS3 protease of dengue virus[J]. Computers in Biology and Medicine, 2021, 134: 104492.

[23] LUO T T, LU Y, YAN S K, *et al*. Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: methodology, application and prospective[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2020, 26(1): 72-80.

[24] 谭武宾, 周松, 康海, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨光甘草定治疗去势抵抗性前列腺癌的作用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(2): 310-318, 259.
TAN Wubin, ZHOU Song, KANG Hai, *et al*. Molecular mechanism of Glabridin in the treatment of castration-resistant prostate cancer based on network pharmacology and experimental verification[J]. Journal of Natural Product Research and Development, 2023, 35(2): 310-318, 259.

[25] 周琼, 杨采彬, 张亚萍, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨金莲花抗流感病毒作用机制[J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(9): 1100-1110.
ZHOU Qiong, YANG Caibin, ZHANG Yaping, *et al.* Exploration on mechanism of anti-influenza virus activity of *Trollius chinensis* Bunge based on network pharmacology and molecular docking [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2022, 39(9): 1100-1110.

[26] 赖桂花, 曹建雄, 周君, 等. 基于网络药理学和实验验证研究壮骨镇痛胶囊治疗骨转移癌痛的活性成分和作用机制用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(12): 2145-2158.
LAI Guihua, CAO Jianxiong, ZHOU Jun, *et al.* Active ingredient and mechanism of Zhuanggu Zhentong capsule in the treatment of cancer-induced bone pain based on network pharmacology and experimental verification[J]. Journal of Natural Product Research and Development, 2024, 36(12): 2145-2158.

[27] TE VELTHUIS A J, FODOR E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(8): 479-493.

[28] WU Y J, FENG W W, WU Z L, *et al.* Prim-O-glucosylcimifugin alleviates influenza virus-induced pneumonia in mice by inhibiting the TGF-β1/PI3KCD/MSK2/RELA signalling pathway[J]. Archives of Virology, 2024, 169(11): 232.

[29] RAHMAN M A, SHOROBI F M, UDDIN M N, *et al.* Quercetin attenuates viral infections by interacting with target proteins and linked genes in chemicobiological models[J]. In Silico Pharmacology, 2022, 10(1): 17-29.

[30] EIERHOFF T, HRINCIUS E R, RESCHER U, *et al*. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells[J]. Public Library of Science Pathogens, 2010, 6(9): e1001099.

[31] WANG W, WU J, ZHANG X, *et al*. Inhibition of influenza A virus infection by fucoidan targeting viral neuraminidase and cellular EGFR pathway[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40760.

[32] ZHANG S, TIAN H, CUI J, *et al.* The c-Jun N-terminal kinase (JNK) is involved in H5N1 influenza A virus RNA and protein synthesis[J]. Archives of Virology, 2015, 161(2): 345-351.

[33] WANG R, ZHU Y, ZHAO J, *et al.* Autophagy promotes replication of influenza A virus *in vitro*[J]. The Journal of Virology, 2019, 93(4): e01984-18.